

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
VON ISOENZYMUSTERN BEI
HYALOMMA IMPRESSUM, H. ANATOLICUM
EXCAVATUM UND H.A. ANATOLICUM
MIT HILFE DER ISOELEKTROFOKUSSIERUNG**

Ingrid Reiter

1480

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON ISOENZYMMUSTERN BEI
HYALOMMA IMPRESSUM, H. ANATOLICUM EXCAVATUM UND
H.A.ANATOLICUM MIT HILFE DER ISOELEKTROFOKUSSIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ingrid Reiter
aus
Bad Schussenried

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bach

Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 29. Februar 1980



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Bisherige Untersuchungen zur Charakterisierung von <i>Hyalomma impressum</i> , <i>H. a. anatolicum</i> , <i>H. a. excavatum</i> sowie Grundlagen und Möglich- keiten einer vergleichenden Untersuchung von Isoenzymen mittels Polyacrylamidgelisoelektro- fokussierung als Hilfsmittel der modernen Taxonomie (anhand der Literatur)	2
III. Eigene Untersuchungen	10
A. Material und Methoden	10
B. Ergebnisse	19
1. Proteine	20
2. Enzyme	23
IV. Besprechung der Ergebnisse	38
V. Zusammenfassung und Summary	43
VI. Literaturverzeichnis	45
Lebenslauf	

I. Einleitung

Seit den ersten Beschreibungen von Zecken der Gattung Hyalomma wurden viele Versuche unternommen, die entsprechenden Arten und Unterarten zu klassifizieren. Die Tatsache, daß sich alle Hyalomma-Arten durch eine große Anpassungsfähigkeit auszeichnen und somit zu einer Veränderung morphologischer Merkmale neigen, stiftete immer wieder Verwirrung unter den Taxonomen. So hatte sich allein die Frage, ob die Formen *H. anatolicum* und *H. excavatum* als Subspezies oder als Spezies zu betrachten seien, zu einem viel diskutierten Problem entwickelt.

Hyalomma-Zecken sind von medizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung, da sie als Vektoren verschiedener Krankheiten gelten und die Leistung von Nutztieren erheblich beeinträchtigen können. Es erscheint somit wünschenswert, in Ergänzung zu konventionellen Differenzierungsmethoden Kriterien für eine eindeutige Identifizierung der fraglichen Arten bzw. Unterarten zu finden.

Gegenstand dieser Untersuchung war es, festzustellen, ob die drei Hyalomma-Arten bzw. Unterarten *H. impressum*, *H. anatolicum anatolicum* und *H. anatolicum excavatum* gleiche oder unterschiedliche Isoenzymmuster aufweisen und ob anhand dieser Isoenzymmuster eine biochemische Charakterisierung möglich ist. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich die Isoelektrofokussierung als Untersuchungsmethode eignet.

II. Bisherige Untersuchungen zur Charakterisierung von Hyalomma impressum, H. a. anaticum, H. a. excavatum sowie Grundlagen und Möglichkeiten einer vergleichenden Untersuchung von Isoenzymen mittels Polyacrylamidgelisoelektrofokussierung als Hilfsmittel der modernen Taxonomie (anhand der Literatur)

KOCH beschrieb 1844 erstmals zwei verschiedene Zeckenpopulationen, die er *Hyalomma anaticum* und *H. excavatum* nannte (zit. HOOGSTRAAL und KAISER, 1959). In den folgenden Jahrzehnten tauchten in verschiedenen entomologischen Sammlungen Zecken auf, die denen von KOCH beschriebenen glichen. Der Versuch, sie nach dem geltenden Schlüssel zu identifizieren, führte zu großen Verwirrungen.

Unabhängig davon beschäftigten sich russische Autoren ebenfalls mit der Klassifizierung von *Hyalomma*-Zecken. So kam POMERANTZEV (zit. HOOGSTRAAL und KAISER, 1959) zu der Überzeugung, daß es sich bei den von KOCH (1844) beschriebenen Zecken nicht um zwei verschiedene Arten, sondern um Unterarten einer Art handelte. Entsprechend seinen Erkenntnissen arbeitete er einen Schlüssel aus, der solange Gültigkeit besaß, bis PERVOMAIKY (zit. HOOGSTRAAL und KAISER, 1959) meinte belegen zu können, daß hier eine einzige, außergewöhnlich polymorphe Art vorliege. Von da an wurde in der russischen Literatur nur noch von einer einzigen Art, und zwar von *H. anaticum* gesprochen.

HOOGSTRAAL und KAISER (1959) deckten schließlich auf, daß die beiden Zeckenpopulationen von russischen und nicht russischen Wissenschaftlern gerade im umgekehrten Sinne benannt worden waren. Nach eingehender vergleichender Untersuchung der Sammlungen von KOCH, KRATZ, POMERANTZEV und anderen arbeiteten sie einen neuen Bestimmungsschlüssel aus. Sie konnten schließlich das Ergebnis von POMERANTZEV (zit. HOOGSTRAAL und KAISER, 1959) bestätigen, nachdem es sich bei den beschriebenen *Hyalomma*-Zecken doch um Unterarten der Art *H. anaticum* handelte. Sie gaben der kleineren Zecke (the Small *Hyalomma*) die Bezeichnung *H. anaticum anaticum*, die größere (the Large Anatolium *Hyalomma*) benannten sie *H. anaticum excavatum*.

Zwischen den beiden Hyalomma-Unterarten gibt es nicht nur Unterschiede in der Morphologie, sondern auch in ihrem biologischen Verhalten. Beide Formen kommen in Nordafrika, im Nahen Osten, in Kleinasien und in Südrubland vor, doch tritt H. a. excavatum dort eher in kleinen, begrenzten Gebieten auf (HOOGSTRAAL und KAISER, 1959). Außerdem suchen sie sich unterschiedliche Wirtstiere.

Als Überträger verschiedener Krankheiten sind sowohl H. a. anatolicum als auch H. a. excavatum beschrieben worden. Erstere gilt als Vektor von Theileria annulata, letztere überträgt den Virus der russischen Frühsommerenzephalitis sowie Coxiella burnetti (Q-Fieber), Theileria annulata und Piroplasmen bei Vögeln (HOOGSTRAAL, 1956).

Hyalomma impressum, die zweite Hyalomma-Art, die in dieser Arbeit untersucht werden soll, wurde von HOOGSTRAAL (1956) als "Westafrikanische Hyalomma" bezeichnet. Die Biologie dieser Zecke beschrieb OGEDEGBE (1979). Entsprechend seinen Angaben befällt sie hauptsächlich das Rind und ist als Vektor von Theileria annulata in Betracht zu ziehen.

In neuerer Zeit strebt man mehr und mehr die Zusammenarbeit zwischen Taxonomen und Wissenschaftlern anderer Gebiete an, wenn es solche schwierige, taxonomische Fragen zu lösen gilt. Nach MAYR (1975) sind auf diese Weise gerade für die Entomologie bemerkenswerte Beiträge geliefert worden. PASTERNAK (1970) betonte, daß die moderne Wissenschaft eine biochemische Erklärung für biologische Phänomene suche. HEALY (1979) sieht in der Untersuchung des Erbmateri als auf genetische Variationen hin ein gutes Hilfsmittel für die moderne Taxonomie. Forschungen auf diesem Gebiet werden durch die Tatsache erleichtert, daß selbst die primitivsten Prokaryonten im Prinzip über dieselben Typen von Makromolekülen und Stoffwechselprozessen verfügen, wie man sie auch bei höchstentwickelten Tieren und Pflanzen findet.

So beschäftigten sich z.B. KILGOUR und GODFREY (1973) mit der Charakterisierung von Trypanosomen und bearbeiteten dieselben Enzymsysteme wie CHUA, CROSSMANN und GILMOUR (1978) bei Süßwasserfischen, NARAYANAN (1977) bei Mäusen, CARTER (1978) bei Plasmodien, AL-TAQI und EVANS

(1978) bei Leishmanien und TOWNSON und MEREDITH (1979) bei Simulien.

Bei der Klärung von Art- bzw. Verwandtschaftsbeziehungen bedient man sich der Tatsache, daß eine Art einer Mendelpopulation entspricht, die durch bestimmte Mechanismen vor schädlichem Genfluß aus anderen Genpools geschützt ist. Eine Art bildet somit eine ökologische und genetische Einheit (MAYR, 1976).

Im Gegensatz dazu ist bei einer Unterart der Genfluß nicht unterbrochen, sondern nur durch teilweise Isolation eingeschränkt. MAYR (1975) definiert die Unterart als eine "Zusammenfassung phänotypisch ähnlicher Populationen einer Art, die ein geographisches Teilgebiet der Art bewohnen und sich taxonomisch von anderen Populationen der Art unterscheiden".

Eine Möglichkeit zur Feststellung genotypischer Variationen bietet die direkte Untersuchung des Erbmaterials. OLIVER (1972) analysierte z.B. die Chromosomensätze 6 ägyptischer Hyalomma-Arten und versuchte herauszufinden, ob es zwischen den Arten nachweisbare Unterschiede in der Struktur gibt und ob diese zytotaxonomischen Merkmale zur Identifizierung der Arten ausreichen. Er kam zu dem Ergebnis, daß die Zytotaxonomie im Hinblick auf die untersuchten Zecken kein brauchbares Mittel sei.

Eine weitere Möglichkeit zur Feststellung genetischer Variationen bietet die vergleichende Untersuchung von Isoenzymen. Der Begriff Isoenzyme wurde von MARKERT und MÖLLER (zit. BERGMAYER, 1974) eingeführt. Sie bezeichneten damit die verschiedenen molekularen Formen eines Enzyms in einem einzigen Organismus. Nach BERGMAYER (1974) ist die Entstehung von Isoenzymen eng verknüpft mit der Gewebedifferenzierung und tritt bei Adaptation an veränderte Stoffwechselbedingungen auf. HARRIS (1975) stellte fest, daß das Phänomen der Isoenzyme ein ziemlich weitverbreitetes sei und wahrscheinlich bei den meisten Enzymen mehr oder weniger stark auftritt. Er unterschied die Isoenzyme entsprechend ihrem Entstehungsmechanismus und teilte sie danach in drei Kategorien ein:

1. Verschiedene Genloki; so sind für die Synthese von Lactat-Dehydrogenase (LDH) drei verschiedene Genloki verantwortlich. Eine Veränderung des Isoenzymusters im Laufe einer Zellentwicklung wird auf eine Veränderung der Aktivität dieser Genloki zurückgeführt.
2. Verschiedene Allele an einem Genlocus; dies führt zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz und ist der Grund für abweichende Proteinstrukturen von Isoenzymen bei Individuen derselben Population.
3. Sekundäre Veränderungen oder "post-translational changes"; darunter werden alle chemischen oder physikalischen Veränderungen zusammengefaßt, wie sie im Laufe der Alterung einer Zelle oder bei der Bearbeitung des Gewebes auftreten können.

Bei Zecken wurden Enzym- bzw. Isoenzymuntersuchungen bisher - soweit bekannt - hauptsächlich zur Aufklärung von Verdauungsvorgängen und Resistenzbildung gegen Akarizide, aber auch im Zusammenhang mit populationsgenetischen Fragen vorgenommen.

TATCHEL (1964) beschäftigte sich mit den Verdauungsvorgängen der Lederzecke *Argas persicus* und beschrieb verschiedene Aktivitätsmuster von Proteinasen. TATCHEL (1971) trennte Proteine aus Hämolymphe, Speichel und Eiern der Zecke *Boophilus microplus* mit Hilfe der Acrylamidgелеlektrophorese und charakterisierte die Proteine als Glycoproteine, Haemoproteine, Esterasen, Phosphatasen und eine Amino-peptidase. Bei 3 Tage alten Eiern konnte der 3 Proteinbanden nachweisen; nach spezifischer Färbung gelang ihm die Darstellung von 7 Glycoproteinen, 2 Haemoproteinen, 7 Esterasen und einer sauren Phosphatase.

BOGIN und HADANI (1973) beschrieben die Aktivität proteolytischer Enzyme im Darm weiblicher Zecken der Spezies *Hyalomma excavatum*. STEPANCHENOK-RUDNIK, GARMAEV und GROKHOVSKAYA (1975) untersuchten das Proteinspektrum gesogener und ungesogener *H. dromedarii*-Zecken mit Hilfe von Polyacrylamidgелеlektrophorese. Es stellte sich heraus, daß das Proteinmuster gesogener und ungesogener Adulten, ausgenommen

das der Geschlechtsorgane, verschieden ist. Sie nahmen an, daß in den Wänden des Verdauungstraktes zwei Verdauungsenzyme synthetisiert werden. REICH und ZORZOPULOS (1978) veröffentlichten Studien über Proteasen bei Larven von *Boophilus microplus*. Sie stellten fest, daß es entsprechend dem Alter der Larven, dem pH-Wert, der Temperatur, dem Substrat u.a. unterschiedliche Aktivitätsgipfel gibt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ZORZOPULOS, REICH und GALASSI (1978) in ihrer Arbeit über Phosphomonoesterase; sie spielen ebenso wie Proteasen im Verdauungsmechanismus eine wichtige Rolle. Die Autoren arbeiteten ebenfalls mit Larven von *B. microplus*.

PENG, CHOW und LIN (1973) untersuchten die Genaktivierung bei Eiern von *B. microplus* im Verlauf der Embryogenese. Sie arbeiteten mit Polyacrylamidgelen und benutzten unspezifische Esterasen als Marker. Bei der Analyse von 1-24 Tage alten Eiern stellten sie fest, daß die Aktivität von Esterasen im Verlauf der Embryogenese zunimmt, und zwar von 4 Isoenzymbanden (1. Tag) auf 10 (17. und 18. Tag). Eine Charakterisierung von Acetylcholinesterase (AChE) akarizidresistenter und verdächtiger Stämme der Zecke *B. microplus* war Gegenstand der Arbeit von NOLAN und SCHNITZERLING (1975). Sie verglichen die Aktivität von AChE 7 Tage alter Larven bei verschiedenen pH-Werten und nach Zugabe unterschiedlicher Inhibitoren.

BULL und SARA (1976) entdeckten einen Esterase-Polyphormismus bei ihren Untersuchungen über die Populationsstruktur der australischen Reptilienzecke *Aponomma hydrosauri*. Sie arbeiteten mit Stärkegelelektrophorese und benutzten als Untersuchungsmaterial männliche Zecken, die von Eidechsen abgesammelt worden waren. Sie beschrieben vier verschiedene Esterasen, wobei sich zwei als konstant und zwei als variabel erwiesen.

HAELY (1979) untersuchte das Enzym Phosphoglucomutase (PGM) bei ungesogenen Adulten der Zecke *Ixodes ricinus*. Das Material stammte aus fünf verschiedenen Gegenden Irlands und wurde im Frühjahr und Herbst

gesammelt. Er konnte nachweisen, daß die PGM in den meisten Fällen polymorph (zwei Isoenzymbanden) war und einen hohen Grad an Variationen aufwies. Die Arbeiten wurden mit Stärkegelelektrophorese durchgeführt. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß das Enzym von einem Genlokus kodiert wird, an dem man wiederum 10 verschiedene Allele unterscheiden kann. Der Autor bringt die örtlichen und zeitlichen Aktivitätsunterschiede verschiedener Populationen derselben Art mit diesen Unterschieden im Genotyp in Verbindung.

HEALY (1979) untersuchte außerdem die Variabilität des Enzyms α -Glycerin-phosphat-Dehydrogenase und benützte als Untersuchungsmaterial dieselben irischen Populationen von *I. ricinus* wie bei der Arbeit über Phosphoglucomutase. Er stellte fest, daß männliche und weibliche Zecken und solche Tiere, die aus verschiedenen Gegenden stammten, eine unterschiedliche Enzymstruktur aufwiesen.

Eine Auftrennung verschiedener Proteinfractionen und damit auch von Enzymen wurde überhaupt erst möglich, seit TISELIUS (zit. RAPOPORT, 1969) die Elektrophorese zu einem analytischen Trennprinzip ausbaute. Seitdem hat man viel versucht, um Trennschärfe und Methode zu verbessern. Die Trägerelektrophorese nahm ihren Anfang mit Einführung der Papierelektrophorese, die 1950 von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde (RAPOPORT, 1969). Einen weiteren Fortschritt bedeutete die Anwendung von Agar- und Kunststoff- und Polyacrylamidgelen.

HUNTER und MARKERT (1957) entwickelten eine Methode zum Nachweis von Esterasen, und zwar durch spezifische enzymatische Farbreaktion nach elektrophoretischer Trennung. Den so gefärbten Elektrophorese-Streifen nannten sie *Z y m o g r a m m*. MARKERT und MÖLLER (zit. BERGMAYER, 1974) gelang mit derselben Methode der Nachweis von Dehydrogenasen.

Eine der neuesten Entwicklungen auf dem Gebiet der Elektrophorese ist die Elektrofokussierung, die in den letzten 10 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (NEUMANN, 1976). Als Trägermaterial dienen hier verbesserte Polyacrylamidgele. Im elektrischen Feld wird ein linearer

und stabiler pH-Gradient aufgebaut und die Proteinmoleküle werden entsprechend ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkten getrennt (WINTER und ANDERSSON, 1977). Nach diesem besonderen Trennprinzip erhielt die Methode die Bezeichnung *I s o e l e k t r o f o k u s s i e r u n g* (IF) (NEUMANN, 1977). Die Vorteile der IF liegen nicht nur in der hohen Trennschärfe und der guten Reproduzierbarkeit, sondern auch darin, daß nur geringe Probenmengen benötigt werden und man sehr viele Proben pro Tag analysieren kann (NARAYANAN, 1977). So gelang es DALE und LATNER (1968), mit der Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung (PAGIF) bei Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus menschlichem Herz und Lebergewebe mehr Isoenzymbanden darzustellen, als man mit der konventionellen Elektrophorese auf Stärke- oder Polyacrylamidgelen erzielt hatte.

ROSS (1976) untersuchte drei verschiedene Enzyme bei *Schistosoma* sp. mit PAGIF und verglich die Ergebnisse mit denen von WRIGHT, SOUTHGATE und KNOWLES (1972), die mit Mikrostärkegelelektrophorese gearbeitet hatten. Er stellte fest, daß deren Ergebnisse im Vergleich zu den seinen nur begrenzten taxonomischen Wert besitzen. Durch letztere Methode war die Probenmenge und somit der Proteingehalt begrenzt und es ergaben sich unbefriedigende Ergebnisse bei der Analyse von Lactat-Dehydrogenase (LDH). Außerdem konnten die Ergebnisse nicht einem meßbaren System, wie z.B. dem pH-Gradienten bei der PAGIF, zugeordnet werden. SHIRLEY und LEE (1977) untersuchten bei Kokzidien drei Enzyme mit zwei verschiedenen Methoden. Mittels Stärkegelelektrophorese konnten sie bei *Eimeria tenella* nur eine einzelne Bande von LDH nachweisen, während es bei der PAGIF 11 Banden waren.

KÜHNEL, SCHMIDTMANN und SPIELMANN (1977) untersuchten das Enzym Phosphoglucomutase (PGM) in menschlichen Erythrozyten mittels PAGIF. Es gelang ihnen, im Vergleich zur Arbeit von SPENCER, HOPKINSON und HARRIS (1964) (Stärkegelelektrophorese) einen erweiterten Polymorphismus der PGM nachzuweisen. NARAYANAN (1977) benutzte die PAGIF zum Nachweis von Genmutationen bei Mäusen und lobte die Methode unter

anderem wegen ihres hohen Auflösungsvermögens. HOUK, CRUZ und HARDY (1978) stellten einen Vergleich an zwischen den Zymogrammen unspezifischer Esterasen von *Culex tarsalis*, die sie nach konventioneller Acrylamidgelelektrophorese und PAGIF erhalten hatten. Mit der ersten Methode konnten sie 5, mit der zweiten 18 verschiedene Esterasen nachweisen.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial dienten 18 Tage alte Eier von *Hyalomma impressum* (Stamm Niger, 1973), von *Hyalomma anatolicum excavatum* (Stamm Syrien) und von *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Stämme Ankara und Ägypten). Während die ersten beiden *Hyalomma*-Arten aus der Zucht des Institutes stammten, stellten mir den Stamm Ankara von *Hyalomma a. anatolicum* Herr Prof. Dr. Schein/Berlin sowie den Stamm Ägypten Herr Priv. Doz. Dr. Liebisch/Hannover dankenswerter Weise zur Verfügung.

Zur Gewinnung der Gelege wurden 20 bzw. 40 Weibchen mit der erforderlichen Anzahl an Männchen an je einem Kaninchen gefüttert. Dazu versah ich die Ohren der Kaninchen mit einem Leinenbeutel, der am Ohransatz mit einem Klebeband befestigt und an der Spitze mit einem Gummiring verschlossen worden war. Nach dem Abfallen vom Wirtstier reinigte ich die vollgesogenen Weibchen mit einer 0,03%igen Bradophen^R-Lösung, trocknete sie und ließ sie einzeln in Rollrandgläschen 3 Tage lang im Brutschrank bei einer Temperatur von 28°C und 85% relativer Luftfeuchtigkeit, um die Beendigung der Guaninausscheidung abzuwarten.

Die zur Durchführung des Versuches verwendeten Eier sollten sich im selben Entwicklungszustand befinden. Die nunmehr nahezu unbeweglichen, vollgesogenen Weibchen wurden deshalb am 4. Tag nach dem Abfallen mit dem Rücken am Deckel einer Plastikpetriscchale (15 mm Höhe, 90 mm Durchmesser) mit Hilfe eines doppeltbeschichteten Klebebandes befestigt. Das Gehäuse war mit mehreren Luftlöchern versehen. Je nach Größe der Zecken fanden darin bis zu 15 Tiere Platz. Bis zum Beginn der Eiablage, je nach Zeckenart 4-14 Tage nach dem Abfall vom Wirtstier, wurde der Boden der Petriscchale, wenn notwendig, mit einer 0,03%igen Bradophen^R-Lösung gesäubert, um einer späteren Verunreinigung oder Verpilzung der Gelege vorzubeugen. Mit Beginn der Oviposi-

tion wurde täglich der Bodenteil des Gehäuses mit den darin befindlichen Gelegen ausgewechselt. Die jeweiligen Tagesgelege inkubierte ich in mit Luftlöchern versehenen Petrischalen im Brutschrank bei einer Temperatur von 28°C und 85% relativer Luftfeuchtigkeit für eine Zeit von 18 Tagen. Nach Entnahme und Prüfung des Eimaterials auf eventuellen Pilzbefall, auf Verunreinigungen sowie den Entwicklungszustand hin, wurden Portionen von 0,2-0,3 g bei -20°C tiefgefroren.

Zur Vorbereitung für die Isoelektrofokussierung (IF) wurde das Material bei 20°C (Raumtemperatur) aufgetaut, mit PBS pH 7,2 versetzt und mit einem Potter Glashomogenisator 4 Min. lang im Eisbad homogenisiert. Das Flüssigkeitsvolumen richtete sich nach dem zur Verfügung stehenden Eimaterial. Verwendet wurde immer ein 6%iges Homogenat, das ich anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 42.000 g 90 Min. lang zentrifugierte. Der Überstand wurde dann über Nacht im Kühlschrank gegen Aqua dest. dialysiert.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY und Mitarb. (1951). Als störend für diese empfindliche Methode erwies sich die der Lösung eigene bräunliche Färbung, die vom Pigment der Eikutikula herrührte, sowie ein brauner Niederschlag, der nach dem Zentrifugieren schon bei geringster Erschütterung wieder aufgewirbelt wurde. Nach wiederholten Messungen stellte ich fest, daß die Proteinkonzentration eines 6%igen Homogenates bei ungefähr 10 mg/ml lag. Später wurde deshalb auf eine Proteinbestimmung verzichtet.

Für die Elektrofokussierung stand das Gerät LKB 2117 Multiphor zur Verfügung sowie das LKB 2103 Stromversorgungsgerät. Die Auftrennung der Proteine bzw. Enzyme erfolgte auf handelsüblichen Gelen vom Typ PAG plates, pH-Bereich 3,5-9,5 mit einer Abmessung von $245 \times 110 \times 1$ mm. Diese Gele zeichnen sich durch den Zusatz von Ampholine^R-Trägerampholyten (2,4% w/v) aus. Die Gelplatten, welche auf einer dünnen Plastikfolie liegen, lassen sich bei Bedarf auf jede gewünschte Größe zuschneiden. Als Elektrodenlösung dienten 1M H_3PO_4 (Anode) und 1M NaOH (Kathode). Bei der Ausführung der Elektrofokussierung

richtete ich mich nach den Angaben von KARLSSON und Mitarb. (1973). Eigene Angaben im Zusammenhang mit der IF beziehen sich immer auf eine ganze Gelplatte.

Die hohe Temperaturempfindlichkeit der Enzyme erforderte eine konstante Kühlung des Materials. Vor Versuchsbeginn wurde deshalb die Kühlplatte des Wasserkühlungsgerätes LKB 2209 Multi Temp, auf der das Gel während der Elektrofokussierung lag, auf 2°C herabgekühlt und diese Temperatur während des jeweiligen Laufes beibehalten. Die Probenaufgabe erfolgte nach einer Vorfokussierung von 10-15 Min. mittels kleiner Filterpapierplättchen (5 x 10 mm, Whatman 3MM). Sie wurden längs des Kathodenstreifens in einer Entfernung von 1,5 cm aufgelegt und nach maximal 45 Min. wieder entfernt. Nach der Auftrennung und im Anschluß an die pH-Messung nahm ich noch eine Nachfokussierung von 10 Min. vor. Die gesamte Laufzeit betrug durchschnittlich 120 Minuten. Über die in verschiedenen Stadien des Experiments erreichten Stromwerte gibt Tabelle 1 Aufschluß.

Zeit/ Min.	Strom- spannung/V	Strom- stärke/mA	Leistung/ W
Start			
0	300	65	20
10-15	420	48	20
60	1160	20	25
110	1400	17	25
120	1500	15	30
Ende			

Tab. 1: Durchschnittliche Werte der Stromversorgung während eines Laufes

Zur Bestimmung des pH-Gradienten wurde der pH-Wert mittels einer Oberflächen-elektrode (Ingold Membran Elektrode) auf einer Geraden zwischen Kathode und Anode im Abstand von 0,5 cm und bei einer Temperatur von 5°C direkt von der Geloberfläche abgenommen. Die Methode entnahm ich der Arbeit von GIANAZZA und Mitarb. (1977). Während der Messung verblieb das Gel auf der Kühlplatte. Den auf diese Weise ermittelten durchschnittlichen pH-Gradienten zeigt Abb. 1.

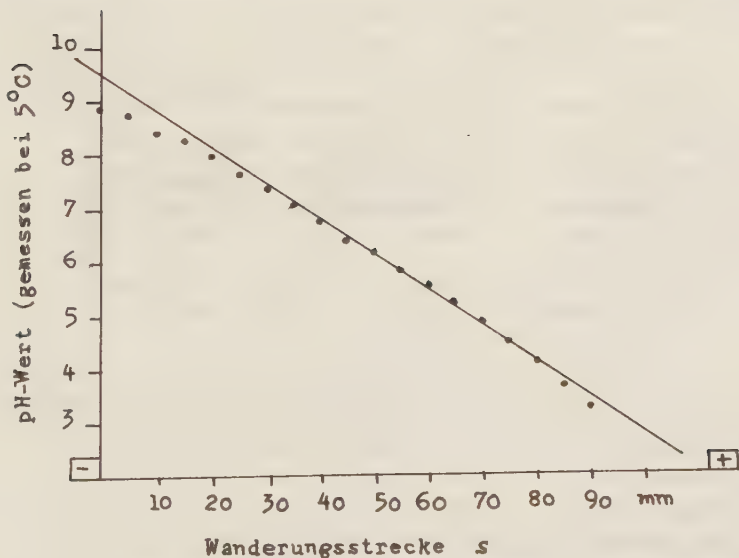


Abb. 1: pH-Gradient nach einer Elektrofokussierung von ca. 110 Min., ermittelt anhand durchschnittlicher pH-Werte, gemessen im Abstand von 0,5 cm

Nach Beendigung der Elektrofokussierung entfernte ich die Elektrostreifen mitsamt darunterliegendem Gel.

Im Anschluß an die IF führte ich eine Protein- bzw. Enzymfärbung durch. Die Elektropherogramme der Proteine stellte ich entsprechend den Angaben von WINTER und ANDERSSON (1977) her. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele für ca. 30 Min. in eine Fixierlösung gebracht und danach für ca. 15 Min. in eine Entfärbelösung. Anschließend wurden die PAG plates ca. 10 Min. mit einer 60°C warmen Färbelösung behandelt und zum Schluß mehrmals in frischer Entfärbelösung gewaschen und zur vollständigen Entfärbung über Nacht in dieser Lösung stehen gelassen. Die Zusammensetzung der erwähnten Lösungen sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

Fixierlösung	Färbelösung	Entfärbelösung
17,3 g Sulfo-salizylsäure	0,46 g Coomassie Brilliant Blue	500 ml Äthanol plus 160 ml
57,5 g Tri-chloressigsäure in 500 ml Aqua dest. gelöst	R 250 in 400 ml Entfärbelösung gelöst	Essigsäure mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt

Tab. 2: Zusammensetzung der für die Proteinfärbung verwendeten Lösungen

Zum Nachweis folgender Enzyme führte ich eine spezifische Färbung durch:

- Lactat-Dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27.)
- Malat-Dehydrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37.)
- Malat-Enzym ("malic enzyme") (ME, E.C. 1.1.1.40.)
- Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6PDH, E.C. 1.1.1.49.)
- Phosphoglucomutase (PGM, E.C. 2.7.5.1.)
- Glucosephosphat-Isomerase (GPI, E.C. 5.3.1.9.)
- Unspezifische Esterasen (E.C. 3.1.1.)
- Aspartat-Aminotransferase (AST, E.C. 2.6.1.1.)
- Alanin-Aminotransferase (ALT, E.C. 2.6.1.2.)

Die Bestimmung der Färbeart, Zusammensetzung der Färbelösung sowie Färbedauer geschah in Anlehnung an Angaben in der Literatur. Einen genauen Überblick über die einzelnen Färbebedingungen mit Angaben der Quellen geben die folgenden Tabellen.

Die Färbebedingungen für die Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) wurden den Arbeiten von AL-TAQI und EVANS (1978), KILGOUR und GODFREY (1973) sowie MILES und Mitarb. (1977) entnommen. Zur Färbung verwendete ich zwei Techniken, und zwar die Inkubation im flüssigen Medium und die Filterpapier-Overlay-Methode. Die Auswertung erfolgte durch Photographieren im UV-Licht bei 350 nm mit einem Hellgrün-Filter. Die Inkubation betrug ca. 40 Minuten. Für die Herstellung des Puffers löste ich 2,96 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ plus 11,50 g Na_2HPO_4 in einem Liter demineralisiertem Wasser.

Enzym	AST	ALT
Puffer	0,1M Phosphat pH 7,4	0,1M Phosphat pH 7,4
Substrat	1,66 mg 2-Oxo- glutarat (1Na) 3,84 mg L-Aspar- tatsäure	1,66 mg 2-Oxo- glutarat (1Na) 20 mg L-Alanin
Coenzym	0,5 mg NADH (2Na)	0,5 mg NADH (2Na)
Zusätze	15U MDH	15U LDH

Tab. 3: Färbebedingungen für die Enzyme Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase
Konzentration in ml^{-1}

Die Zymogramme von Glucosephosphat-Isomerase (GPI), Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6PDH) und Phosphoglucomutase (PGM) stellte ich in Anlehnung an die Arbeiten von AL-TAQI und EVANS (1978), CARTER (1973), McMANUS und SMYTH (1979), MILES und Mitarb. (1977) sowie SUTTON und BURGEDESS (1978) her.

Enzym	GPI	PGM	G-6-PDH
Puffer	0,1M Tris-HCL pH 7,4	0,3M Tris-HCL pH 8,0	0,1M Tris-HCL pH 7,4
Sub- strat	0,8 mg D-Fructose- 6-Phosphat (2Na)	2 mg Glucose-1- Phosphat 0,2 mg Glucose- 1,6-di- phosphat	0,4 mg D-Glucose-6- Phosphat (1Na)
Coenzym	0,8 mg NADP	0,5 mg NADP	0,4 mg NADP
Zusätze	0,8U G-6PDH 2 mg MgCl ₂ 0,16 mg MTT 0,08 mg PMS 0,2 mg Agarose- EF	0,8U G-6PDH 0,8 mg EDTA 1 mg Histidin- hydrochlorid 2 mg MgCl ₂ 0,16 mg MTT 0,08 mg PMS 0,2 mg Agarose- EF	2 mg MgCl ₂ 0,16 mg MTT 0,08 mg PMS 0,2 mg Agarose- EF
Färbe- dauer	20 Min	60 Min.	30 Min.

Tab. 4: Färbebedingungen für die Enzyme Glucosephosphat-Isomerase, Phosphoglucomutase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase
 MTT = Dimethyl-Thiazolyl-diphenyl-Tetrazolium-Bromid
 PMS = Phenazinmethosulfat.
 Die Konzentration der Stoffe ist angegeben in ml⁻¹

Bei der Färbung der Enzyme Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Malat-Dehydrogenase (MDH) richtete ich mich nach den Angaben in ORTEC AN 32A (1973). Die Färbebedingungen für das Malat-Enzym (ME) entnahm ich der Arbeit von McMANUS und SMYTH (1979).

Enzym	LDH	MDH	ME
Puffer	0,05M Tris-Glyzin pH 8,4 90 ml	0,05M Tris-Glyzin pH 8,4 90 ml	0,1M Tris-HCL pH 7,4
Substrat	600 mg Lithium-Lactat	800 mg Apfelsäure	0,4 mg L-Malat (Na)
Coenzym	40 mg NAD	40 mg NAD	0,4 mg NADP
Zusätze	20 mg NBT 1 mg PMS	20 mg NBT 1 mg PMS	0,16 mg NBT 0,08 mg PMS
Färbedauer	20 Min.	20 Min.	bis zu 24 Stunden

Tab. 5: Färbebedingungen für die Enzyme Lactat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase und Malat-Enzym. Zur Herstellung der Färbelösungen von Lactat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase wurden die Substanzen in 16 ml Aqua dest. gelöst und dann zum Puffer dazugegeben. NBT = Nitro-blue-tetrazolium; PMS = Phenazinmethosulfat. Konzentration bei Malat-Enzym in ml⁻¹

Das Zymogramm der unspezifischen Esterasen stellte ich nach den Angaben von NARAYANAN (1977) her. Zur Färbung der unspezifischen Esterasen versetzte ich 96 ml Pufferlösung (0,05M Tris-HCL, pH 6,6) mit 4 ml einer 1%igen α -Naphthylacetat-Lösung (in Azeton gelöst) und 150 mg Fast Red TR. Vor Gebrauch wurde das Ganze gefiltert. Die Färbedauer betrug durchschnittlich 20 Minuten.

Die Färbung der Enzyme erfolgte grundsätzlich durch Inkubation im flüssigen Medium. Daneben wendete ich auch die Agarose-Overlay- oder Sandwich-Technik (Tab. 4) an (SUTTON und BURGEDESS, 1978). Beiden Techniken ist gemeinsam, daß man nach der Elektrofokussierung eine Enzym-Substrat-Reaktion ablaufen läßt und die Reaktionsprodukte über ein selektives Färbeverfahren sichtbar macht. Bei ersterer Methode wurden in diesem Versuch die notwendigen Chemikalien in 100 ml eines für das zu bestimmende Enzym optimalen Puffers gelöst (Färbelösung) und das Gel in dieser Lösung inkubiert. Für das zweite Verfahren stellte ich 10 ml einer 1%igen Agarose-Lösung (Agarose EF) her, ließ sie auf 56°C abkühlen und versetzte sie mit 10 ml der entsprechenden Färbelösung. Das Gemisch wurde auf die hydrophile Seite einer Plastikfolie (84 x 94 mm, LKB) gleichmäßig aufgegossen und nach dem Erstarren unter Vermeidung von Luftblasen auf das anzufärbende Gel gelegt.

Die Inkubation erfolgte immer im Dunkeln, und zwar in Metallschalen aus rostfreiem Stahl und im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C. Die Färbedauer wählte ich entsprechend dem Zeitpunkt des Sichtbarwerdens der ersten Banden.

Nach der Färbung wurden die Gele lagerungsfähig gemacht. Zu diesem Zwecke kamen sie 5 Min. in eine Konservierungslösung aus Methanol-H₂O-Glycerin (75:20:5) und danach für 1 1/2 Stunden in den Brutschrank bei 50°C; diese Zeit wurde jedoch je nach vorausgegangener Inkubationsdauer auf bis zu 3 Stunden ausgedehnt. Abschließend bedeckte ich die nun klebrig gewordene Geloberfläche mit einer dünnen Plastikfolie (20 x 10 cm).

Zur Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse wurden die Zymogramme photographiert, mit Hilfe eines Densitometers (Zeiss 4442) aufgezeichnet und schematisch wiedergegeben. Anhand dieser Aufzeichnungen erfolgte eine Charakterisierung der verschiedenen Isoenzym- bzw. Proteinfractionen, und zwar durch Zuordnung zu ihrem isoelektrischen Punkt (pI), der dem in gleicher Entfernung von der Kathode (Wanderungsstrecke s) ermittelten pH-Wert entspricht.

B. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt vergleichend und gegliedert nach Protein bzw. den einzelnen Enzymen.

Die densitometrischen Aufzeichnungen wurden je nach vorherrschender Hintergrundfärbung mit einem Rot- bzw. Grünfilter gemacht. Die durchschnittliche Wanderungsstrecke der Fraktionen betrug 90 mm, was auch ungefähr der Gelbreite nach Abtrennung der Elektrodenstreifen entsprach.

Die Probenauftragsstelle, 1,5 cm von der Kathode entfernt, wurde mit Pfeilen gekennzeichnet ($\longrightarrow$), wenn dort eine Farbreaktion abgelaufen war. Mit einer Wellenlinie ($\sim$) markierte ich eine Erscheinung, die bei jedem Lauf an annähernd derselben Stelle auftrat. Es handelte sich wahrscheinlich um eine Ansammlung von Zellmaterial aus der Probenlösung, dem nicht gelöste Enzyme anhafteten. Sollte es in diesen Bereichen zu Farbreaktionen gekommen sein, so blieben die Stellen bei der Auswertung der Pherogramme oder Zymogramme immer unberücksichtigt.

Die einzelnen Fraktionen numerierte ich in der Reihenfolge ihrer Auftrennung im Gel, so daß die der Kathode am nächsten liegende Bande die niedrigste, die am schnellsten bewegliche Fraktion die höchste Zahl erhielt. Als Wanderungsstrecke s bezeichnete ich die Entfernung vom kathodischen Ende des Gels bis zu der entsprechenden Fraktion. Sie wurde in mm gemessen. Da sich Enzymfraktionen im Gegensatz zu Proteinfractionen oftmals als breitere Banden anfärbten, sind alle Zahlenangaben im Zusammenhang mit der Wanderungsstrecke s als Mittelwerte zwischen kathodischer und anodischer Begrenzung der Bande zu verstehen. Diese Mittelwerte bildeten die Grundlage für die Berechnung der isoelektrischen Punkte (pI-Werte) der einzelnen Fraktionen.

Die mit "Hyalomma anatolicum anatolicum⁺" bezeichneten Zecken (Stamm Ankara) wurden zu Vergleichszwecken herangezogen. Es handelt sich dabei um einen Stamm, bei dem sich wahrscheinlich infolge einer

Virusinfektion erhebliche Deformationen eingestellt hatten, wie fehlende oder doppelt angelegte Beine bei Adulten und eine schlechte Häutungsrate bei Nymphen. Nachdem die Adulten der den erkrankten Zecken folgenden Generation morphologisch intakt erschienen, wurden die Eier von Weibchen dieser Generation für den Versuch benutzt. *H. a. anatolicum*⁺ führte ich nur dann gesondert auf, wenn sich ein von *H. a. anatolicum* (Stamm Ägypten) abweichendes Isoenzymmuster ergab.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch mehrere Läufe abgesichert.

1. Proteine

Die Proteinfractionen, wie ich sie nach der Auftrennung der Homogenate 18 Tage alter Eier der untersuchten Hyalomma-Zecken erhielt, zeigen Abb. 2 und 3. Bei *Hyalomma a. excavatum* und *H. a. anatolicum* (Stamm Ägypten) treten 22 deutlich zu unterscheidende Banden im Elektropherogramm auf, bei *H. impressum* nur 18.

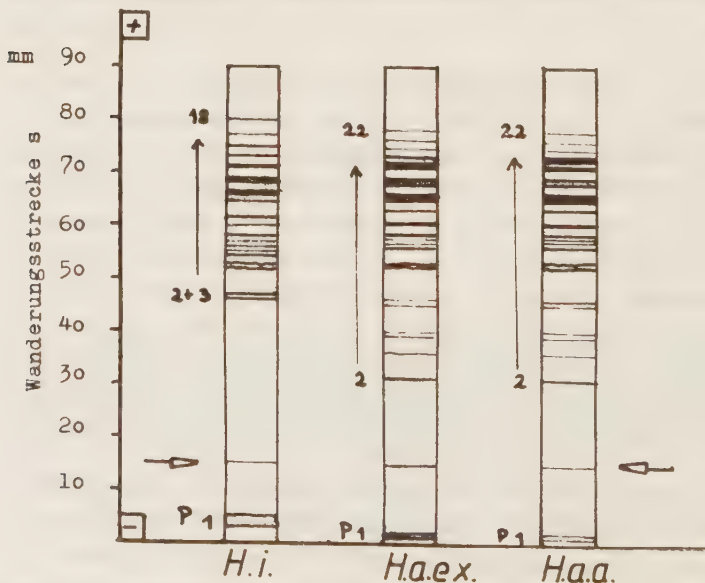


Abb. 2: Elektropherogramme wasserlöslicher Proteine aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

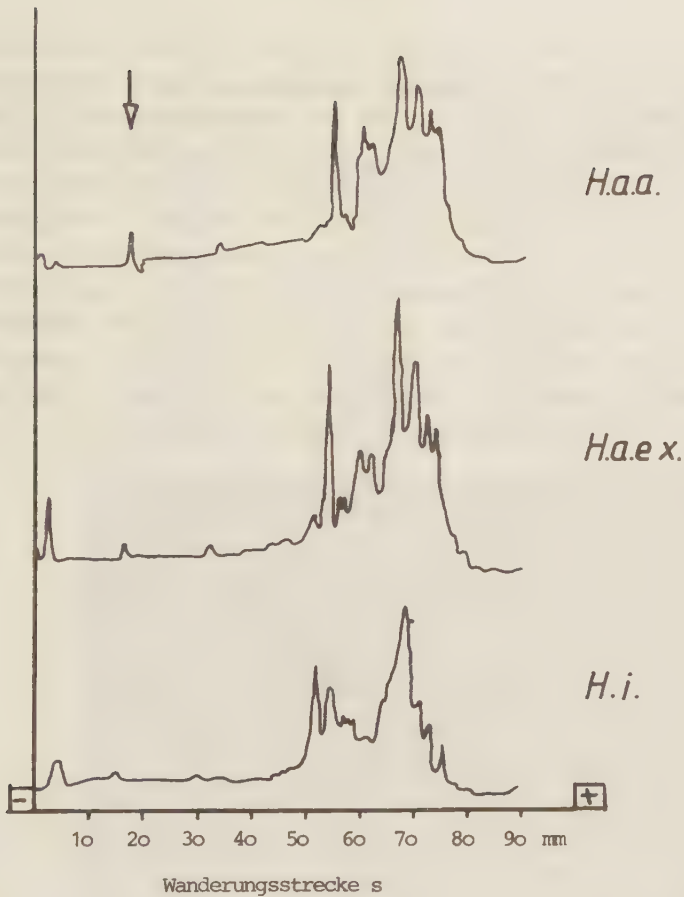


Abb. 3: Densitometrische Aufzeichnung der Elektropherogramme wasserlöslicher Proteine aus 18 Tage alten Eiern von 3 *Hyalomma*-Arten bzw.-Unterarten

Die meisten Proteinfractionen fanden sich auf der anodischen Hälfte des Gels.

Protein- fraktionen (P)	H.i.	H.a.ex.	H.a.a.
1	8,4	8,5	8,5
2	6,1	7,1	7,1
3	6,05	6,8	6,8
4	5,8	6,55	6,55
5	5,75	6,5	6,5
6	5,7	6,1	6,1
7	5,6	6,05	6,05
8	5,5	5,7	5,7
9	5,4	5,6	5,6
10	5,3	5,5	5,5
11	5,1	5,45	5,45
12	5,0	5,35	5,35
13	4,8	5,2	5,2
14	4,7	5,0	5,0
15	4,5	4,85	4,85
16	4,35	4,8	4,8
17	4,3	4,7	4,7
18	4,0	4,6	4,5
19		4,5	4,45
20		4,35	4,35
21		4,3	4,3
22		4,2	4,2

Tab. 6 : pI-Werte der Proteinfractionen wasserlöslicher Proteine aus Eiern (18 Tage alt) von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

Wie die Elektropherogramme zeigen, besaßen die Eier beider Hyalomma-Unterarten ein nahezu identisches Proteilmuster. Der einzige Unterschied bestand in der Mobilität der Fraktion P₁₈. Während sie bei H. a. excavatum eine Strecke (s) von 72 mm zurücklegte sowie einen

pI-Wert von 4,6 hatte (Tab. 2) und damit näher an Fraktion P_{17} lag, fand man sie bei *H. a. anatolicum* (Ägypten, $s = 73$, $pI = 4,5$) näher an P_{19} . Die Empfindlichkeit des von mir benutzten Densitometers war jedoch zu gering, um diese feinen Unterschiede aufzuzeichnen (Abb. 3). Im Gegensatz dazu fielen beim Vergleich der artspezifischen Proteinmuster von *H. impressum* und *H. a. excavatum* bzw. *H. a. anatolicum*, trotz mehrerer sich überlappenden Fraktionen, ganz charakteristische Unterschiede auf. So fehlten im Pherogramm von *H. impressum* z.B. die Fraktionen zwischen $s = 30$ und $s = 45$, einem Bereich, in dem die Fraktionen $P_2 - P_5$ von *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum* erschienen. Auch P_1 sowie P_{14} , die bei allen am intensivsten gefärbte Bande, zeigten bei *H. impressum* andere elektrophoretische Eigenschaften.

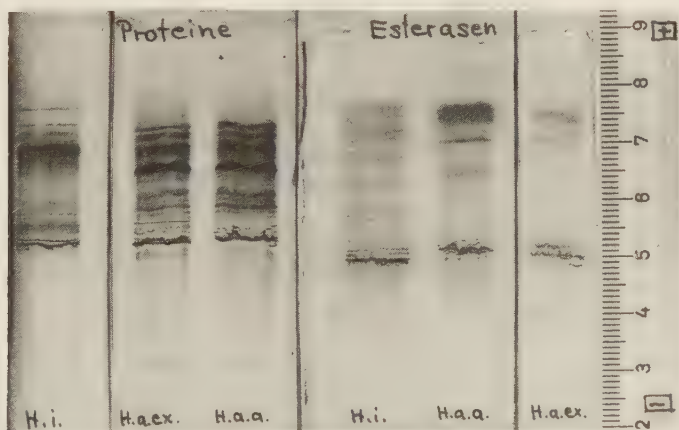


Abb. 4: Vergleich der Elektrophero- bzw. Zymogramme wasserlöslicher Proteine bzw. unspezifischer Esterasen aus 18 Tage alten Eiern von 3 *Hyalomma*-Arten bzw. -Unterarten

2. Enzyme

a. Unspezifische Esterasen

Insgesamt gelang mir die Darstellung von 6 (*H. a. excavatum*) bzw. 7 (*H. impressum* und *H. a. anatolicum*, Ägypten) Isoenzymen (Abb. 5 und 6). Überraschend war eine gewisse Ähnlichkeit der Zymogramme mit den Pherogrammen der Proteine im Hinblick auf die Verteilung

der Fraktionen (Abb. 4). So tauchten bei *H. impressum* auf der kathodischen Hälfte der Gelplatte keine, auf der anodischen dagegen im Vergleich zu *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum* (Ä.) vermehrt Isoenzyme auf. Es fehlten dem Zymogramm von *H. impressum* somit Banden bei $s = 39$ und $s = 44$, doch lagen zwei bei $s = 63$ und $s = 68$. (Abb. 5, Abb. 6).



Abb. 5: Zymogramme unspezifischer Esterasen aus 18 Tage alten Eiern von 3 *Hyalomma*-Arten bzw. -Unterarten



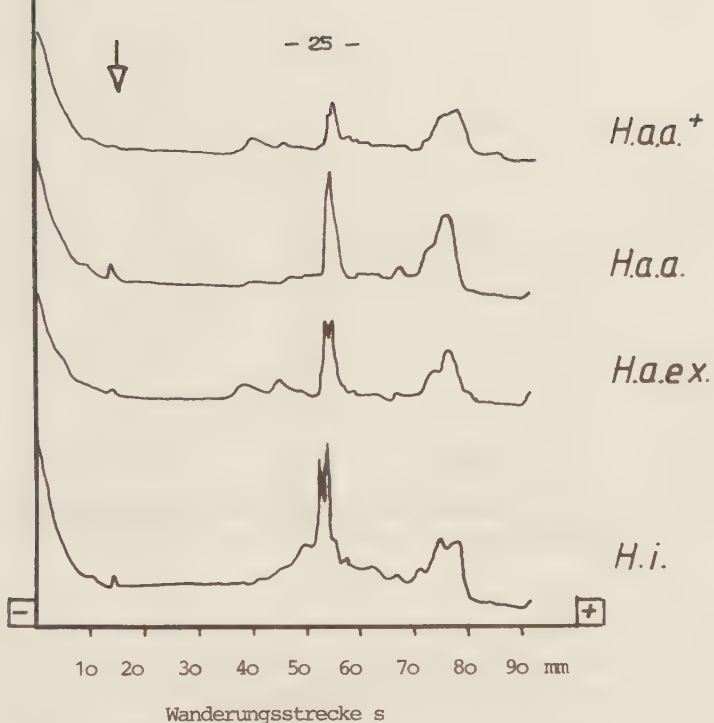


Abb. 6: Densitometrische Aufzeichnung von Zymogrammen unspezifischer Esterasen aus 18 Tage alten Eiern von 3 *Hyalomma*-Arten bzw. -Unterarten

Bei vergleichender Betrachtung der Zymogramme der Unterarten fiel bei *H. a. anatolicum* (Ä.) das Isoenzym E_3 ($s = 68$, $pI = 4,85$) auf, das bei *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum* (Ankara) fehlte. (Tabelle 7).

Außerdem zeigten die beiden am schnellsten beweglichen Fraktionen (E_5 und E_6) von *H. anatolicum* (Ä.) eine intensivere Färbung als die der anderen Unterarten.

Zecken- art bzw. -Unter- art	Fraktionen (E)						
	1	2	3	4	5	6	7
H.i.	5,2	4,9	4,75	4,55	4,45	4,2	4,1
H.a.ex.	6,7	6,4	4,6	4,5	4,3	4,2	
H.a.a. (Ä)	6,65	6,2	4,85	4,5	4,3	4,05	
H.a.a. ⁺ (An)	6,7	6,4	4,75	4,45	4,1		

Tab. 7: pI-Werte von Isoenzymen unspezifischer Esterasen aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

Bei H. a. anatolicum⁺ (Ankara) zeigten sich 4 Isoenzyme (E_{1,2,4,5}), die sich mehr oder weniger mit 4 Isoenzymen (E_{1,2,4,6}) von H. a. anatolicum (Ä.) deckten, jedoch fehlten diesem Stamm, verglichen mit H. a. anatolicum (Ä.), die E₃ und E₅ entsprechenden Fraktionen.

b. Lactat-Dehydrogenase, LDH

Das Enzym katalysiert die Reaktion



Es erwies sich im Falle von H. impressum und H. a. anatolicum als monomorph; dagegen tauchten bei H. a. excavatum 2 und 3 Isoenzyme auf (Abb. 7 und 8). Die Banden lagen alle kathodennahe. Die pI-Werte der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

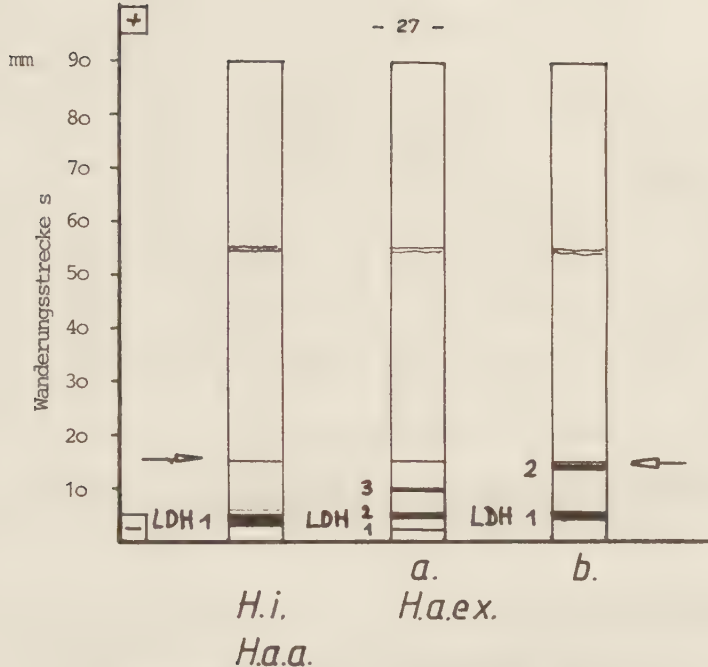


Abb. 7: Zymogramme von LDH aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

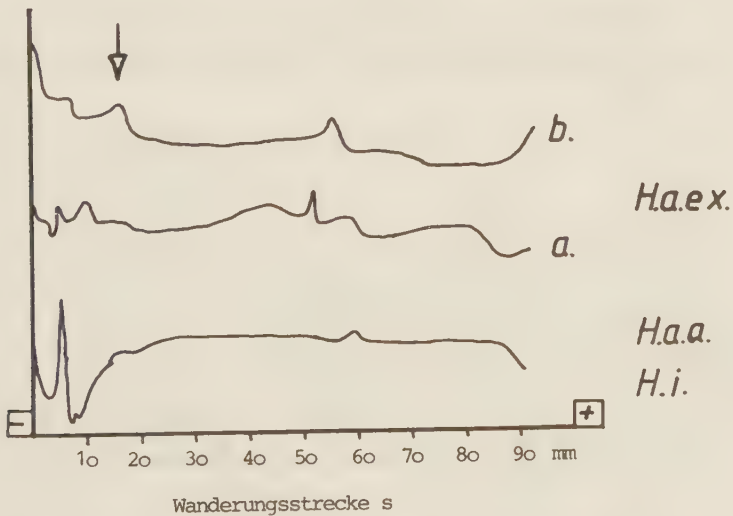


Abb. 8: Densitometrische Aufzeichnung der Zymogramme von LDH aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

Zeckenart bzw. -Unterart	Fraktionen (LDH)		
	1	2	3
H.i. und H.a.a.	8,8		
H.a.ex. (a.)	8,9	8,75	8,4
H.a.ex. (b.)	8,75	8,2	

Tab. 8: pI-Werte der Isoenzyme von Lactat-Dehydrogenase von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

c. Malat-Dehydrogenase, MDH

Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:



MDH stellte sich bei allen 3 Arten bzw. Unterarten monomorph dar und lag extrem kathodennahe mit $s = 3$ und $pI = 8,9$ (Abb.9 und 10).

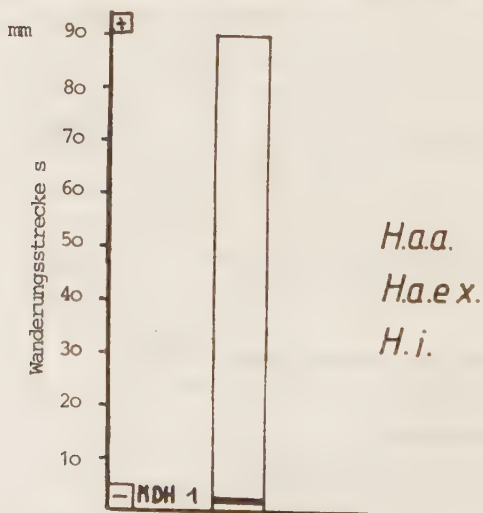


Abb. 9: Zymogramm von MDH von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten aus 18 Tage alten Eiern

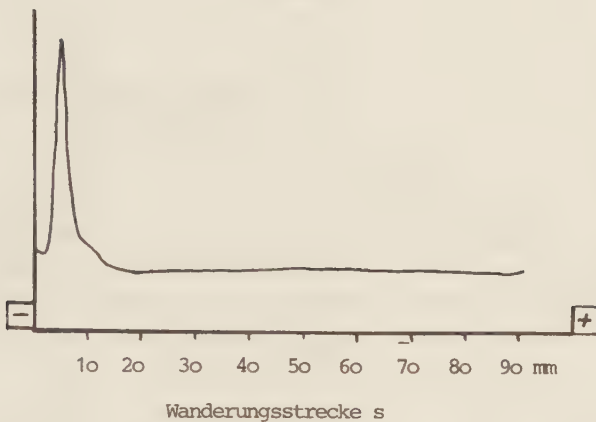


Abb. 10: Densitometrische Aufzeichnung des Zymogramms von LDH aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

d. Malat-Enzym, ME

Dieses Enzym katalysiert im aeroben Kohlenhydratabbau die reduzierende Karboxylierung des Pyruvats zu Malat.



Trotz wiederholter Versuche ließ sich das Enzym nicht nachweisen.

e. Glucose-6-phosphatdehydrogenase, G-6PDH

Dieses Enzym katalysiert die Reaktion:



Die Zymogramme aller 3 Zeckenarten bzw. -Unterarten waren identisch. Das Enzym erwies sich als monomorph. Die Bande war anodenwärts unscharf ($s = 23$) abgegrenzt (Abb. 11 und 12). Der pI-Wert betrug 7,9. Die mit der Overlay-Technik sowie der Inkubation im flüssigen Medium erzielten Ergebnisse unterschieden sich nicht voneinander. Aufgrund der starken Eigenfärbung des Gels stellte sich die Bande im Densitogramm nicht deutlich dar.

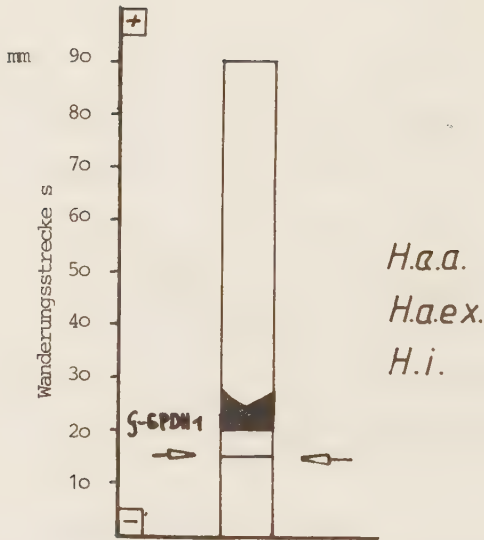


Abb. 11: Zymogramm von Glucose-6-phosphatdehydrogenase der 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

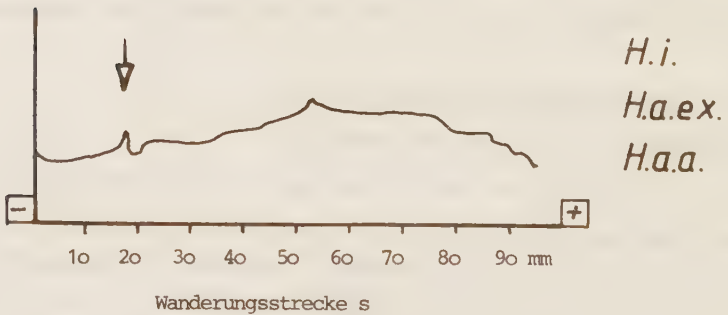
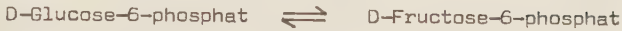


Abb. 12: Densitometrische Aufzeichnung des Zymogramms von Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

f. Glucosephosphat-Isomerase, GPI

Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Es gelang mir, 3 nahe der Kathode gelegene Isoenzyme nachzuweisen, wobei GPI_2 ($s = 8$, $\text{pI} = 8,6$) und GPI_3 ($s = 10$, $\text{pI} = 8,45$) sich im Gegensatz zu GPI_1 ($s = 5$, $\text{pI} = 8,8$) nur als sehr schwache Banden zeigten (Abb. 13 und 14).

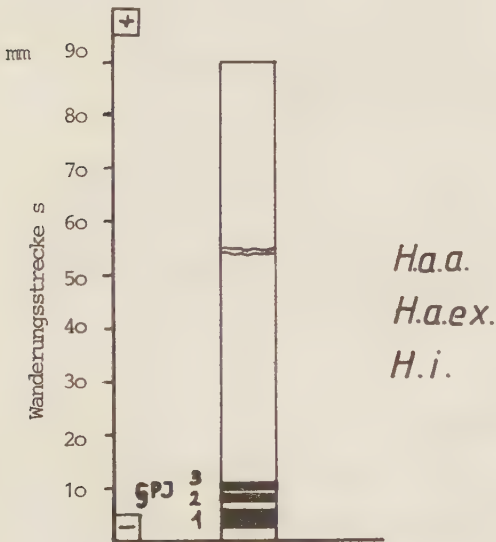


Abb. 13: Zymogramm von Glucosephosphat-Isomerase aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

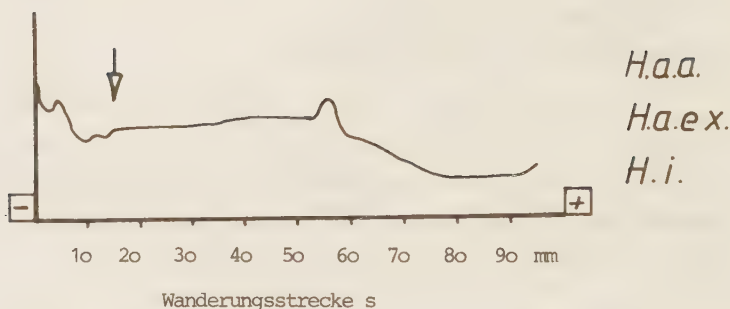


Abb. 14: Densitometrische Aufzeichnung des Zymogramms von Glucosephosphat-Isomerase aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

Bei Anwendung der Overlay-Technik diffundierte das Enzym in das Agarose-Overlay. In diesem entstand bei GPI_1 ($s = 3$) eine intensive Farbreaktion, während an entsprechender Stelle im Polyacrylamidgel eine breite, helle Bande erschien. GPI_2 und GPI_3 konnten mit dieser Technik nicht nachgewiesen werden.

g. Phosphoglucomutase, PGM

Das Enzym katalysiert die Reaktion:



Anhand der Zymogramme ließen sich für *H. impressum* und *H. a. anatolicum*⁺ (Ankara) 5 Isoenzyme, für *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum* (Ägypten) jeweils 4 Isoenzyme nachweisen (Abb. 15 und 16). Die Zymogramme der beiden Unterarten waren identisch, *H. a. anatolicum*⁺ unterschied sich von *H. a. anatolicum* (Abb. 17) durch das zusätzliche Isoenzym PGM_2 ($s = 74$, $pI = 4,6$). *H. impressum* zeichnete sich aus durch die beiden Banden PGM_1 und PGM_2 im kathodischen Bereich. Die pI -Werte der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

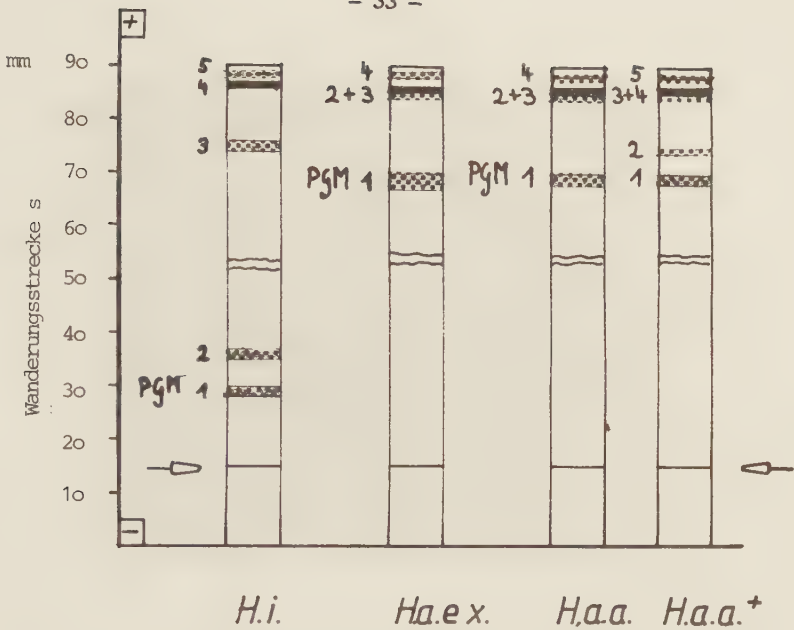


Abb. 15: Zymogramme von Phosphoglucomutase aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. Unterarten

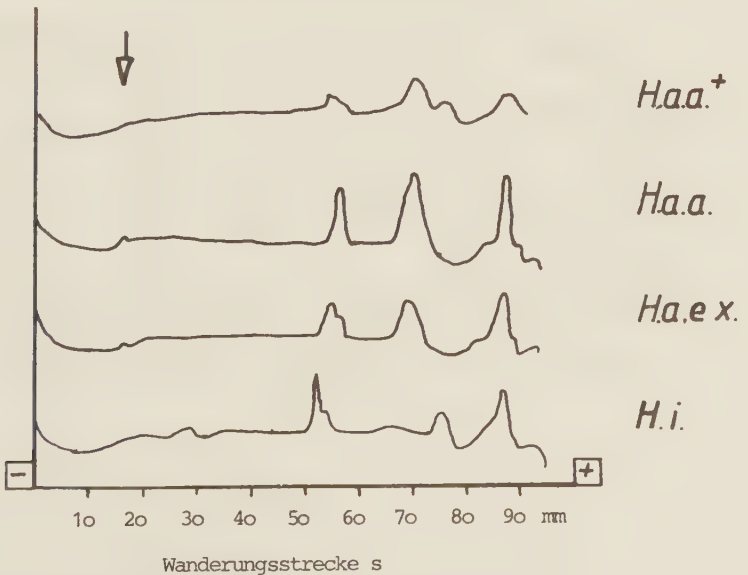


Abb. 16: Densitometrische Aufzeichnung von Zymogrammen von Phosphoglucomutase aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

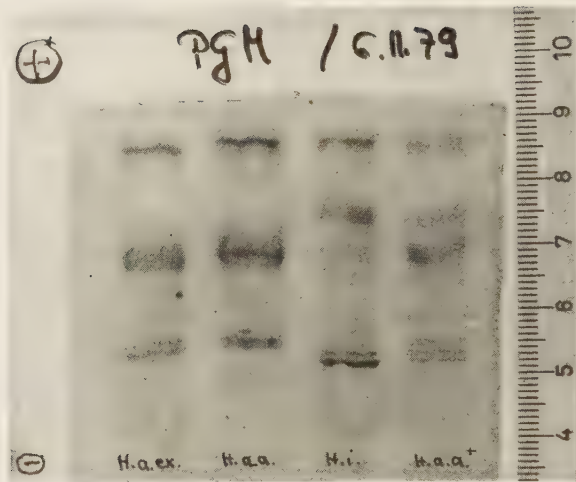


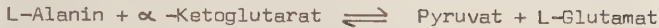
Abb. 17: Zymogramme von Phosphoglucomutase aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

Zeckenart bzw. -Unterart	Fraktionen (PGM)				
	1	2	3	4	5
H.i.	7,6	7,0	4,5	3,75	3,6
H.a.ex.	5,0	3,8	3,75	3,6	
H.a.a.	5,0	3,8	3,75	3,6	
H.a.a. ⁺	5,0	4,6	3,8	3,75	3,6

Tab. 10: pI-Werte der Isoenzyme von Phosphoglucomutase

h. Alanin-Aminotransferase, ALT

Das Enzym katalysiert die Reaktion:



Die Isoenzyme konnten nur durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden (350 nm) und erschienen dann als dunkelgraue, relativ breite Zonen. Die zeichnerische Darstellung der Zymogramme basierte einmal auf der Markierung der Banden auf PAG plates an der Stelle ihres Auftretens unter UV-Licht sowie der Markierung auf Filterpapier. Zu diesem Zwecke wurde ein Filterpapier auf die Größe der zu bedeckenden Gelplatte zugeschnitten und eine Seite als kathodisches Ende gekennzeichnet. Anschließend wurde das Papier mit ca. 10 ml der Färbelösung getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Geloberfläche aufgelegt. Nach Beendigung der Inkubation ließ ich das Papier im Brutschrank trocknen. Danach wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht (350 nm) die Isoenzyme sichtbar gemacht und markiert. Bei dieser Methode bleiben selbst nach einer Inkubationszeit von mehr als 2 Stunden nahe beieinanderliegende Banden, z.B. ALT_1 und ALT_2 von *H. a. excavatum*, scharf getrennt. Bei Inkubation im flüssigen Medium dagegen waren die Banden nach dieser Zeit durch Diffusion ineinander übergegangen und nicht mehr unterscheidbar (Abb. 18).

Wie aus den Zymogrammen (Abb. 19) ersichtlich wird, trat bei *H. impressum* und *H. a. anatolicum* nur jeweils eine Bande auf, die sich aber durch ihre elektrophoretischen Eigenschaften unterschieden. So ist ALT_1 von *H. impressum* bei $s = 22$ ($pI = 8$) lokalisiert, ALT_1 von *H. a. anatolicum* dagegen bei $s = 33$ ($pI = 7,2$). Bei *H. a. excavatum* ließen sich zwei Isoenzyme, ALT_1 ($s = 31$, $iP = 7,4$) und ALT_2 ($s = 36$, $pI = 7,0$), nachweisen.

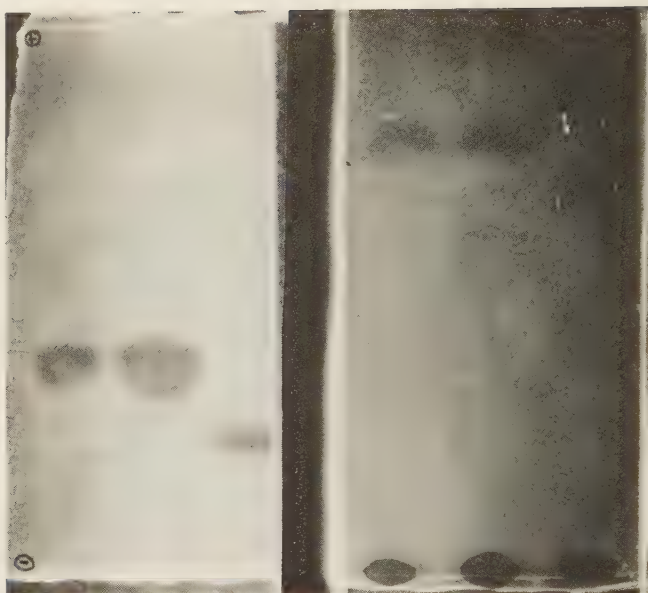


Abb. 18: Zymogramme von Alanin-Aminotransferase (links) bzw. Aspartat-Aminotransferase (rechts) aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten. Von links nach rechts: *H. a. anatolicum*, *H. a. excavatum*, *H. a. impressum*. Inkubation im flüssigen Medium

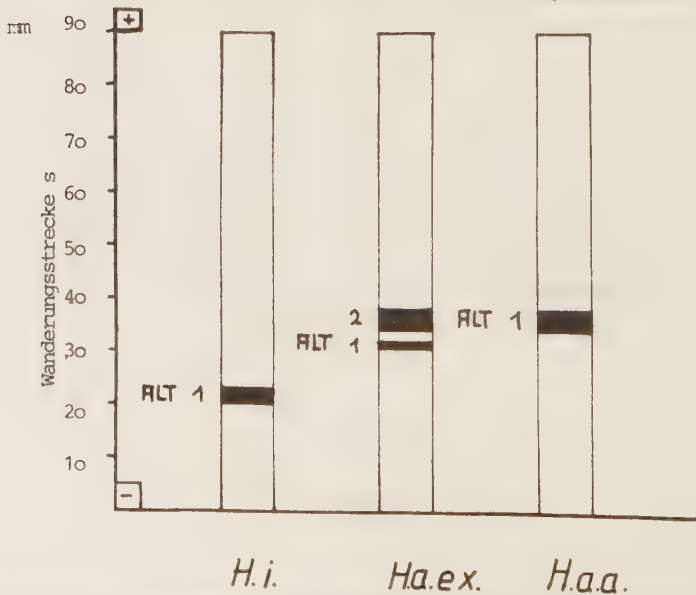
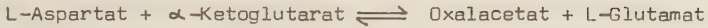


Abb. 19: Zymogramme von Alanin-Aminotransferase aus 18 Tage

1. Aspartat-Aminotransferase, AST

Das Enzym katalysiert die Reaktion:



Die Zymogramme wurden ebenfalls nach der Filterpapier-Overlay-Methode wie bei ALT hergestellt (Abb. 18 und 20).

Bei allen untersuchten Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten traten zwei Isoenzyme auf. AST_1 befand sich bei allen 3 Zymogrammen an derselben Stelle und lag sehr nahe an der Kathode ($s = 3$, $\text{pI} = 8,8$). Während AST_2 von *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum* identisch waren ($s = 70$, $\text{pI} = 4,9$), konnte es bei *H. impressum* durch die Werte $s = 63$ und $\text{pI} = 5,3$ charakterisiert werden.

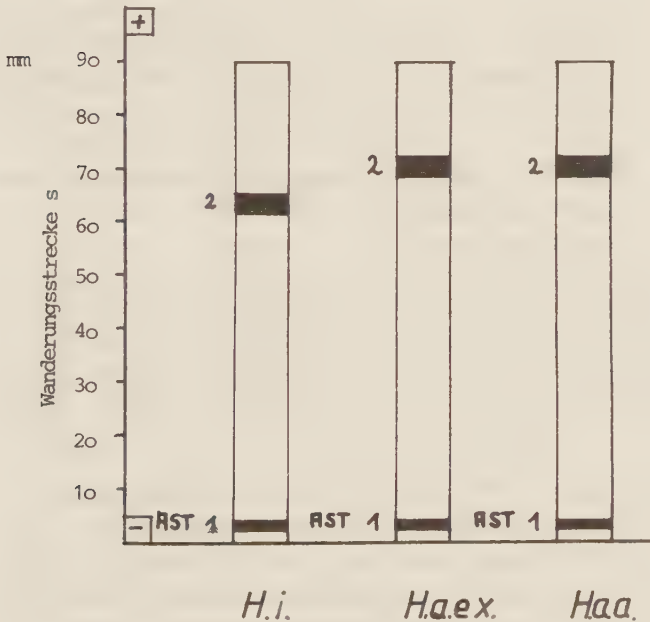


Abb. 20: Zymogramme von Aspartat-Aminotransferase aus 18 Tage alten Eiern von 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten

VI. Besprechung der Ergebnisse

Eine Proteindifferenzierung wurde zu Beginn der eigentlichen Untersuchung vorgenommen und sollte einen groben Überblick über die zu erwartende Enzymverteilung vermitteln. Die meisten Proteinfractionen befanden sich auf der anodischen Seite des Gels. Dies entspricht auch einer Beobachtung von DOLP und HAMDY (1971), welche die Haemolymphe mehrerer Hyalomma-Arten untersuchten. Die von mir dargestellten Proteinmuster erscheinen differenziert genug für eine Unterscheidung der untersuchten Hyalomma-Arten, während ich den auf der abweichenden Mobilität nur einer Bande beruhenden Unterschied im Proteinmuster der Unterarten als zu unbedeutend für deren einwandfreie Identifizierung erachte.

Im Verlauf meiner Arbeit untersuchte ich 9 Enzyme. Von diesen stellten sich 5 (unspezifische Esterasen, LDH, PGM, ALT, AST) als brauchbar für eine biochemische Taxonomie der untersuchten Zecken heraus, während sich ein Enzym nicht darstellen ließ (ME); die restlichen 3 waren bei allen 3 untersuchten Zeckenarten bzw. -Unterarten identisch. Es handelt sich dabei um MDH und G-6PDH, die nur eine Bande zeigten sowie um GPI, das 3 Isoenzyme aufwies.

Ein Vergleich der Zymogramme der unspezifischen Esterasen ergab ein charakteristisches Bild für jede der 3 Hyalomma-Arten bzw. -Unterarten. Anhand der Pherogramme ließen sich außerdem die Stämme Ankara und Ägypten von Hyalomma a. anatolicum eindeutig voneinander abgrenzen.

Wie IGBOKWE und DOWNE (1978) bei der Analyse von 3 Aedes aegypti-Stämmen stellte auch ich bei den untersuchten Hyalomma-Zecken eine gewisse Ähnlichkeit im Verteilungsmuster der Protein- und Esterasebanden fest. Die große Zahl an unspezifischen Esterasen, wie sie auch PENG (1973) bei seiner Untersuchung von Boophilus microplus-Eiern beschrieb, ist sicher auf den hohen Gehalt an Lipiden (KAMAL und KAMEL, 1977) zurückzuführen. BULL und SARA (1976) konnten nur

durchschnittlich 3 verschiedene Esterasen bei Adulten von *Aponomma hydrosauri* nachweisen.

Die unspezifischen Esterasen zeichneten sich durch eine hohe Stabilität aus. So konnte ich bei Eiern von *Hyalomma a. excavatum* nach 4-monatiger Lagerung des unverarbeiteten Materials ebenso wie nach 4-wöchiger Aufbewahrung des Homogenates bei jeweils -20°C keinen Aktivitätsverlust beobachten, der bei der angewandten Nachweismethode sichtbar geworden wäre.

Bei den Zymogrammen traten jedoch immer, wie auch bei anderen Enzymen, Unterschiede in der Farbintensität der einzelnen Banden auf. Allerdings erlaubt die Versuchsanordnung keine Aussage darüber, ob die intensivere Färbung die Folge einer erhöhten Aktivität des entsprechenden Enzyms oder die Folge einer Überlappung mehrerer Fraktionen war. Im Falle der unspezifischen Esterasen könnten die unterschiedlich starken Farbreaktionen auf die Anwesenheit verschiedener Typen von Esterasen zurückzuführen sein.

Das Bandenmuster von Lactat-Dehydrogenase (LDH) war im Falle von *Hyalomma impressum* und *H. a. anatolicum* identisch, zeigte aber im Falle von *H. a. excavatum* 2 Erscheinungsbilder. Neben Zymogrammen mit 3 Isoenzymbanden traten auch solche mit nur 2 Banden auf. Da die Verarbeitung der Proben immer auf dieselbe Art und Weise erfolgt war, konnte ein Aktivitätsverlust in Form einer fehlenden Bande nur durch unterschiedlich lange Lagerungsdauer der tiefgefrorenen Eier (-20°C) erklärt werden. Sie betrug in ersterem Falle 2 Monate, in letzterem 3. Keinen Aktivitätsverlust beobachtete ich nach einer 2-wöchigen Lagerung des Homogenats bei -20°C . In diesem Zusammenhang sollte auch bedacht werden, daß Weibchen von *H. a. excavatum* zur Parthenogenese befähigt sind, was zu einer Verminderung der Enzymvariabilität führen könnte. Nach McMANUS und SMYTH (1979) tritt eine Reduktion von Isoenzymen bei Selbstbefruchtung und Inzucht auf.

Isoenzymvariationen von LDH können somit nach meinen Untersuchungen nur zur Charakterisierung der Unterarten von *Hyalomma a. excavatum* und *H. a. anatolicum* herangezogen werden.

Malat-Enzym (ME), das sich nicht darstellen ließ, lag wohl im Homogenat nicht oder in zu geringer Konzentration vor. Dies mag entweder darauf zurückzuführen sein, daß ME nicht in löslicher Form vorliegt oder darauf, daß infolge eines geringen O_2 -Gehaltes im Ei die Glykolyse hauptsächlich anaerob ablaufen dürfte.

Bei der Analyse des Homogenates 18 Tage alter Eier von *Hyalomma impressum*, *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum*, Stämme Ägypten und Ankara, fand ich 3 verschiedene Phänotypen von Phosphoglucomutase (PGM) bei bis zu 5 Banden, von denen 2 in jedem Zymogramm sehr deutlich, die übrigen nur schwach angefärbt waren. HEALY (1979) stellte fest, daß die von ihm bei *Ixodes ricinus* beschriebene Zahl dokumentierter Variationen von PGM die höchste aller bisher gefundenen innerhalb einer Spezies war. Er erwähnte auch das Auftreten von schwach gefärbten Nebenbanden, die immer in einer bestimmten Entfernung anodenwärts von der Hauptbande lagen. Sie scheinen sehr häufig im PGM-Muster vieler Tierarten aufzutauchen und werden als nicht genetisch bestimmte Isomere betrachtet. Inwieweit die von mir beobachteten schwach gefärbten Banden als solche anzusehen sind, bedarf weiterer Untersuchungen. Einer Bewertung von PGM als Grundlage einer Charakterisierung der untersuchten Zecken legte ich die Zymogramme von Abb. 15 zugrunde. Diese Ergebnisse ließen eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Arten zu, nicht aber der Unterarten. Es war jedoch eine Unterscheidung der beiden *Hyalomma anatolicum*-Stämme möglich, da bei *H. a. anatolicum* (Ankara) eine Änderung in Anzahl und Mobilität von Isoenzymen auftrat.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Zymogramme von Aspartat-Aminotransferase (AST) fiel die unterschiedliche Mobilität einer Enzymfraktion auf, welche eine Identifizierung der Arten *Hyalomma impressum* und *H. anatolicum* zuläßt.

Ein weiteres Enzym, das sich zur Charakterisierung der untersuchten Hyalomma-Zecken eignete, war Alanin-Aminotransferase (ALT). Es zeigten sich sowohl Spezies- als auch Subspezies-spezifische Merkmale bei der Darstellung des Enzyms.

Die bei der Gegenüberstellung der beiden Stämme Ankara und Ägypten von Hyalomma a. anatolicum auftretenden Unterschiede im Isoenzymmuster zweier Enzyme (unspezifische Esterasen, PGM) warfen interessante Fragen auf. So könnten die abweichenden Enzymstrukturen des Stammes Ankara auf zwei Entstehungsursachen zurückgeführt werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß eine Veränderung von Enzymstrukturen der Ausdruck dieses Stammes für eine Anpassung an andere Umweltbedingungen darstellt, wie HEALY (1979) es bei *I. ricinus* beschrieb. Andererseits ist nicht außer acht zu lassen, daß der Stamm Ankara durch die pathologischen Vorgänge auf ca. 1/10 der ursprünglichen Zahl reduziert wurde. Die Überlebenden Zecken stellen den Teil der Population dar, der sich gegenüber dem krankmachenden Agens widerstandsfähiger als der Rest erwiesen hatte. Hierbei könnte es auch zur Selektion bestimmter Genotypen gekommen sein, die wiederum den Grundstock für die folgende Generation bildeten.

An diesem Punkt zeigten sich deutlich die Gefahren und Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse solcher Untersuchungen. Proteine bzw. Enzyme sind ein direktes Abbild genetischer Informationen und stellen einen äußerst empfindlichen Marker für genetische Variationen dar. Im großen und ganzen kann deshalb jedes Enzym, das inter- oder intraspezies-spezifische Unterschiede zeigt, nützlich für eine Identifizierung sein (GODFREY, 1979), wie es auch meine Untersuchungen bewiesen. Im Zymogramm der variablen Enzyme befanden sich immer 1-2 konstante und reproduzierbare Fraktionen, die kennzeichnend für die jeweilige Art oder Unterart waren. Unter Einbeziehung der Zymogramme von *Hyalomma a. anatolicum* (Ankara) muß jedoch eine eindeutige Identifizierung der Unterarten anhand der

untersuchten Enzyme so lange in Frage gestellt bleiben, bis weitere Untersuchungen verschiedener Stämme von *H. a. anatolicum* bzw. *H. a. excavatum* Klärung verschaffen über den Grad genetischer Variationen zwischen den Stämmen der Unterarten. Die Genauigkeit und Verlässlichkeit der Methode nimmt außerdem mit der Zahl der untersuchten Enzyme zu. Mehr als 100 sind bisher nachweisbar (HOPKINSON, 1979).

Die biochemische Charakterisierung auf der Basis von 4 der untersuchten Enzyme eignet sich somit für eine eindeutige Unterscheidung der Arten *Hyalomma impressum* und *H. anatolicum*, während sie zur Differenzierung der Unterarten *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum* nur als Hilfsmittel zusammen mit anderen taxonomischen Bestimmungsmethoden verwendet werden sollte.

Die Isoelektrofokussierung mit Polyacrylamidgelen hat sich bei meinen Untersuchungen als ausgezeichnetes Mittel zur Proteinauftrennung bewährt. Die Probenaufgabe ist einfach und es können viele verschiedene Proben unter denselben Bedingungen fokussiert werden. Die pH-Messung mit Hilfe einer Oberflächenelektrode ist einfach in der Ausführung. Der enge Kontakt des Gels mit der Kühlplatte bewirkt eine ausreichende Kühlung, was für einen anschließenden Enzymnachweis besonders wichtig ist. Die Dauer eines Laufes kann durch Verwendung hoher Voltzahlen sehr kurz gehalten werden, was besonders bei instabilem Material von Vorteil ist.

V. Zusammenfassung

Es wurden mit Hilfe der Isoelektrofokussierung in Polyacrylamidgelen die Isoenzymmuster von 9 Enzymen aus Homogenaten 18 Tage alter Eier von *Hyalomma impressum*, *H. a. excavatum* und *H. a. anatolicum* verglichen. Zur Untersuchung kamen unspezifische Esterasen (E.C. 3.1.1.), Lactat-Dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27), Malat-Dehydrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37), Malat-Enzym (ME, E.C. 1.1.1.40), Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G-6PDH, E.C. 1.1.1.49), Phosphoglucomutase (PGM, E.C. 2.7.5.1.), Glucosephosphat-Isomerase (GPI, E.C. 5.3.1.9.), Aspartat-Aminotransferase (AST, E.C. 2.6.1.1.) und Alanin-Aminotransferase (ALT, E.C. 2.6.1.2.).

Die Enzymmuster von MDH, GPI und G-6PDH waren bei allen 3 *Hyalomma*-Arten und -Unterarten identisch. ME ließ sich nicht darstellen. Art- und Unterart-spezifische Unterschiede zeigten sich im Isoenzymmuster der unspezifischen Esterasen sowie von PGM und ALT, während AST nur speziesspezifische und LDH nur subspeziesspezifische Unterschiede im Isoenzymmuster aufwiesen. Die Isoenzymmuster der PGM und der unspezifischen Esterasen des Stammes Ankara von *Hyalomma a. anatolicum* wichen deutlich von denen des Stammes Ägypten ab.

Die Isoelektrofokussierung in Polyacrylamidgelen hat sich als ein ausgezeichnetes Mittel zur Auftrennung und Charakterisierung von Proteinen bzw. Enzymen erwiesen; sie stellt eine wertvolle Methode für taxonomische Untersuchungen an Schildzecken dar.

INGRID REITER: Comparative examinations of the isoenzyme patterns of *Hyalomma impressum*, *H. anatolicum excavatum*, and *H. a. anatolicum* by means of isoelectric focusing

Summary

Homogenates of 18 days old eggs of *Hyalomma impressum*, *H. a. excavatum*, and two strains of *H. a. anatolicum* were compared on the basis of their isoenzyme patterns for 9 enzymes by means of isoelectric focusing in polyacrylamide gels. The enzymes examined were nonspecific esterases (E.C. 3.1.1.), lactate dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27.), malate dehydrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37), malic enzyme (ME, E.C. 1.1.1.40.), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PDH, E.C. 1.1.1.49.), phosphoglucosmutase (PGM, E.C. 2.7.5.1.), glucosephosphate isomerase (GPI, E.C. 5.3.1.9.), aspartate aminotransferase (ASAT, E.C. 2.6.1.1.), and alanine aminotransferase (ALAT, E.C. 2.6.1.2.).

The isoenzyme profiles of MDH, GPI, and G-6PDH turned out to be identical for all species and subspecies of *Hyalomma* under investigation. Specific staining for ME yielded no result. Inter- and subspecies-specific differences were apparent in the isoenzyme patterns of nonspecific esterases, PGM, and ALAT. The isoenzyme patterns of ASAT and LDH respectively revealed only species or subspecies specific differences. Obvious differences appeared in the isoenzyme profiles of the *H. a. anatolicum* strains Ankara and Egypt as far as nonspecific esterases and PGM were concerned.

Isoelectric focusing in polyacrylamide gels proved to be a useful method for the separation and characterization of proteins and enzymes respectively and therefore a valuable tool in taxonomy.

VI. Literaturverzeichnis

- Al-Taqui, M., D.A. Evans (1978): Characterization of *Leishmania* spp. from Kuwait by isoenzyme electrophoresis.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 56-65
- Bergmeyer, H.U. (1974): Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim
- Bogin, E., A. Hadani (1973): Digestive enzymes in "hard ticks" (Ixodoidea, Ixodidae). I. Proteolytic enzyme activity in the gut of *Hyalomma excavatum* female ticks.
Z. Parasitenkd. 41, 139-146
- Bull, M., G.J. Sara (1976): The population structure of an Australian reptile tick *Aponomma hydrosauri* (Acari: Ixodidae). I. Evidence from an esterase polymorphism.
J. Med. Ent. 13, 137-142
- Carter, R. (1973): Enzyme variation in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium vinckei*. Parasitology 66, 297-307
- Carter, R. (1978): Studies on enzyme variation in the murine malaria parasites *Plasmodium berghei*, *P. yoelii*, *P. vinckei* and *P. chabaudi* by starch gel electrophoresis.
Parasitology 76, 241-267
- Chua, K.E., E.J. Crossman, C.A. Gilmour (1978): Lactat dehydrogenase (LDH) isoenzymes in muscle of fresh-water fish by isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide gel.
Science Tools 25, 9-11
- Dale, G., A.L. Latner (1968): Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Lancet 1, 847-848
- Dolp, M.R., B.H. Hamdy (1971): Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Protein electrophoretic studies of certain biological fluids of *Argas* (Argasidae) and *Hyalomma* (Ixodidae). J. Med. Ent. 8, 636-642
- Gianazza, E., P.G. Righetti, S. Bordini, G. Papeschi (1977): pH determination in isoelectric focusing with an Iridium electrode.
in: Radola, B.J., D. Graesslin Electrofocusing and isotachopheresis. Verlag Walter de Gruyter, Berlin
- Godfrey, D.G. (1979): The zymodemes of Trypanosomes. In: A.E.R. Taylor, R. Muller: Problems in the identification of parasites and their vectors. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 31-53

- Harris, H. (1975): The principles of human biochemical genetics. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-Oxford
- Healy, J.A. (1979): Phosphoglucomutase polymorphism in the tick *Ixodes ricinus*. *Parasitology* 78, 7-17
- Healy, J.A. (1979): Analysis of α -Glycerophosphate dehydrogenase variability in the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Genetica* 50, 19-30
- Hoogstraal, H. (1956): African Ixodoidae. I. Ticks of the Sudan. U.S. Naval Medical Research Unit No. 3, Cairo
- Hoogstraal, H., M.N. Kaiser (1959): Observations on Egyptian Hyalomma ticks (Ixodoidea, Ixodidae). 5. Biological notes and differences in identity of *H. anatolicum* and its subspecies *anatolicum* Koch and *excavatum* Koch among Russian and other workers. Identity of *H. lusitanicum* Koch. *Ann. Entom. Soc. America* 52, 243-261
- Hopkinson, D.A. (1979): Introduction. In: A.E.R. Taylor, R. Muller. Problems in the identification of parasites and their vectors. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1-6
- Houk, E.J., W.O. Cruz, J.L. Hardy (1978): Electrophoretic characterization of the non-specific esterases of the mosquito, *Culex tarsalis*: conventional and isoelectric focused acrylamide gels. *Comp. Biochem. Physiol.* 61 B, 291-295
- Hunter, R.L., C.L. Markert (1957): Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125, 1294-1295
- Igbokwe, E.C., A. Downe (1978): Electrophoretic and histochemical comparison of three strains of *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol.* 60 B, 131-136
- Kamal, K.A., M.Y. Kamel (1977): Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Total lipids and phospholipids during oogenesis and embryogenesis of *Dermacentor andersoni* (Ixodidae) and *Argas (Persicargas) arboreus* (Argasidae). *J. Med. Ent.* 14, 204-207
- Karlsson, C., H. Davies, J. Ohman, U.B. Andersson (1973): Application Note 2117. LKB-Produkter AB, Stockholm

- Kilgour, V., D.G. Godfrey (1973): Species-characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosomes.
Nature New Biology 244, 69-70
- Kühnl, P., U. Schmidtman, W. Spielmann (1977): Untersuchungen zum Polymorphismus der Phosphoglucomutase mittels isoelektrischer Focussierung auf Polyacrylamidgele (PAGIF).
7. Intern. Tagung Gesell. forens. Blutgruppenkunde Hamburg, 25.-29.Sept. 1977, 243-252
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951): Proteinmeasurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Mayr, E. (1975): Grundlagen der zoologischen Systematik.
Verl. Paul Parey, Berlin, Hamburg
- McManus, D.P., J.D. Smyth (1979): Isoelectric focusing of some enzymes from *Echinococcus granulosus* (horse and sheep strains and *E. multilocularis*).
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 73, 259-265
- Miles, M.A., P.J. Toye, S.C. Oswald, D.G. Godfrey (1977): The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 217-225
- Narayanan, K.R. (1977): Detection of biochemical mutants in mice.
Arch. Toxicol. 38, 61-73
- Neumann, G. (1976): Analytische Elektrofokussierung.
GIT - Fachzeitsch. Laboratorium, 1212-1217
- Nolan, J., H.J. Schnitzerling (1975): Characterization of acetylcholinesterases of acaricide-resistant and susceptible strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.).
Pesticide Biochem. Physiol. 5, 178-188
- Ogedegbe, E.M. (1979): Untersuchungen über die Biologie von *Hyalomma impressum* (Koch, 1844) unter Laborbedingungen.
Vet. med. Diss., München
- Oliver, J.H. jr. (1972): Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea).
8. Chromosomes of six species of Egyptian *Hyalomma* (Ixodidae).
J. Parasit. 58, 611-613
- Ortec Application Note (1973): Staining Techniques, Appendix C.
Ortec Appl. Note AN 32 A, 24-27
- Pasternak, C.A. (1970): Biochemistry of differentiation.
Wiley-Interscience, London, New York, Sydney, Toronto

- Peng, C.T., Y.S. Chow, P.C. Lin (1973): Esterase activity in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husb. 23, 8-13
- Rapoport, S.M. (1969): Medizinische Biochemie. VEB Verlag Volk und Gesundh., Berlin
- Reich, G.I., J. Zorzopulos (1978): *Boophilus microplus*: Characterization of larval proteases. Exp. Parasit. 44, 1-6
- Ross, G.C. (1976): Isoenzymes in *Schistosoma* spp.: LDH, MDH, and acid phosphatases separated by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. Comp. Biochem. Physiol. 55 B, 343-346
- Shirley, M.W., D.L. Lee (1977): Isoelectric focusing of coccidial enzymes. J. Parasit. 63, 390-392
- Spencer, N., D.A. Hopkinson, H. Harris (1964): Phosphoglucomutase polymorphism in man. Nature 204, 742-745
- Stepanchenok-Rudnik, G.I., A.TS. Garmayev, I.M. Grokhovskaya (1975): A study of the protein spectrum of organs from blood-fed and empty *Hyalomma dromedarii* ticks by electrophoresis in polyacrylamide gel. Med. Parazitol. Parazitarnye Bol. 44, 433-437. Ref.: Rev. appl. Ent. B 64, 372
- Sutton, J.G., R. Burgdoss (1978): Phosphoglucomutase polymorphism in human erythrocytes. Vox. sang. 34, 97-103
- Tatchell, R.J. (1964): Digestion in the tick *Argas persicus* Oken. Parasitology 54, 423-440
- Tatchell, R.J. (1971): Electrophoretic studies on the proteins of the haemolymph, saliva, and eggs of the cattle tick *Boophilus microplus*. Insect. Biochem. 1, 47-55
- Townson, H., S.E.O. Meredith (1979): Identification of the Simuliidae in relation to onchocerciasis. In: A.E.R. Taylor, R. Muller. Problems in the identification of parasites and their vectors. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 145-174
- Winter, A., K.Ek, U.-B. Andersson (1977): Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels. LKB Application Note 250, 1-9

- Wright, C.A., V.R. Southgate, R.I. Knowles (1972): What is *Schistosoma intercalatum* Fisher, 1934?
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 28
- Zorzopulos, J., G.I. Reich, N. Galassi (1978): *Boophilus microplus*: Characterization of larval phosphomonoesterases and isolation of subcellular fractions with high phosphatase activity.
Exp. Parasit. 45, 128-138.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit unter besten Bedingungen.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. C. Centurier für seine wissenschaftliche Anleitung und stete Hilfsbereitschaft.

Für die technische Mithilfe möchte ich mich bei Fräulein Renate Schmid vielmals bedanken.

Lebenslauf

Am 4. April 1954 wurde ich als zweite Tochter der Eheleute Willi Reiter und Elisabeth, geb. Anritter in Bad Schussenried/Kreis Ravensburg geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule von 1961-1965 und des math.-naturwissenschaftlichen Gymnasiums von 1965-1973 in Wangen/Allgäu legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1973 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und bestand hier am 11.1.1979 das tierärztliche Staatsexamen.

Ab Februar 1979 fertigte ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München die vorliegende Doktorarbeit an.

